



Facultad de Ciencias Químicas

**“FARMACOGENÉTICA DE LOS INHIBIDORES DEL
COTRANSPORTADOR SODIO-GLUCOSA TIPO 2 (iSGLT2) EN
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II”.**

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas

de la Universidad Católica de Córdoba

para obtener el título de Farmacéuticas.

Autoras

MIJOEVICH GEORGINA

MILANESIO ESTEFANÍA SOLEDAD

Córdoba

2015

Director del Trabajo Final

Bioq. Pablo Yang

Cátedra de Biotecnología

Co Director de Trabajo Final

Dr. Néstor Soria

Cátedra de Biotecnología.

Comisión de Trabajo Final

Doctora Carpinella Cecilia

Magister Zaragoza Mariano Hugo

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Católica de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Director de Trabajo Final, Bioquímico Pablo Yang por su asesoramiento científico, dedicación y esfuerzo, por su paciencia, conocimientos y su constante seguimiento.

A nuestro Co- Director, Doctor Néstor Soria por el aporte, conocimientos, y ayuda durante la realización del Trabajo final.

Agradecemos también las indicaciones y dedicación de los profesores de la Cátedra de Trabajo Final, Doctora Cecilia Carpinella y Magister Mariano Hugo Zaragoza que sin sus consejos este trabajo no se hubiera podido realizar.

Principalmente a nuestros padres que nos dieron la oportunidad de estudiar y estuvieron en cada uno de nuestros momentos, tanto malos como buenos, impulsándonos y alentándonos para que lleguemos a la meta final.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| Índice de Abreviaturas | VII |
| Índice de Figuras | VIII |
| Índice de Tablas | IX |
| | |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Patología: diabetes Mellitus tipo II | 1 |
| 1.2 Clasificación | 2 |
| 1.3 Tratamiento de la diabetes | 4 |
| 1.4 Nuevos tratamientos para la diabetes | 14 |
| 1.5 El riñón y la regulación de la glucosa: filtración y reabsorción de la glucosa en el riñón | 15 |
| 1.6 Función del cotransportador SGLT2 | 16 |
| 1.7 Inhibición del cotransportador SGLT2 para el tratamiento de la diabetes Mellitus tipo II | 17 |
| | |
| 2.0 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 Generales | 21 |
| 2.2 Específicos | 21 |
| | |
| 3.0 HIPÓTESIS | 22 |
| | |
| 4.0 MATERIALES Y MÉTODO | 23 |
| 4.1 Tipo de estudio | 23 |
| 4.2 Pacientes control | 23 |
| 4.3 Criterios de inclusión | 23 |
| 4.4 Criterios de exclusión | 24 |
| 4.5 Muestras | 24 |
| 4.6 Procedimientos | 24 |

| | |
|-------------------------|----|
| 5.0 RESULTADOS | 29 |
| 6.0 DISCUSIÓN | 31 |
| 7.0 CONCLUSIÓN | 32 |
| 8.0 BIBLIOGRAFÍA | 33 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A: Adenina

ADA: American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes).

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AMP: Adenosinmonofosfato.

AMP K: Adenosinmonofosfato dependiente de potasio.

ATP: Adenosintrifosfato.

C: Citosina.

cAMP: Adenosinmonofosfato cíclico.

DDP-4: Dipeptidil peptidasa-4.

DM II: Diabetes Mellitus tipo II.

dNTPs: Deoxinucleósido trifosfato.

G: Guanidina.

GTC: Isotiocianato de guanidina.

h: Hora.

iSGLT2: Inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2.

K ATP: Adenosintrifosfato dependiente de potasio.

L: Litro.

GLP 1: Péptido-1 análogo al glucagón.

MAOI: Inhibidor de la monoaminoxidasa.

Min: Minutos

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa.

PKA: proteína quinasa A.

PPAR gamma: Receptor activador de la proliferación del peroxisoma gamma.

RFLP: Polymorphism restriction fragment length (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).

r.p.m: Revoluciones por minuto.

SGLT2: Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2.

T: Timina.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismo de inhibición del cotransportador SGLT2 en el túbulo proximal. | 17 |
| Figura 2. Electroforesis de la PCR-RFLP en gel de agarosa, bajo luz ultravioleta. | 29 |
| Figura 3. Electroforetograma del fragmento amplificado. | 30 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Preparación de muestras para la amplificación por PCR. | 26 |
| Tabla 2. Preparación de muestras para la digestión enzimática. | 28 |

1.0 INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de padecimientos caracterizados por la presencia de glucosa elevada en sangre, pero también condiciona alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las proteínas por lo tanto es una enfermedad metabólica degenerativa. Es una enfermedad grave y progresiva que afecta a un gran número de personas a nivel mundial (Cornejo Herrera, 2011).

En la actualidad los tratamientos no han sido suficientes para controlar esta enfermedad metabólica. Investigaciones recientes han desarrollado nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción a los ya conocidos.

Entre 1980 y 1990 se logra identificar el transportador SGLT2, y se comienzan a realizar estudios para inhibir dicho transportador como parte del tratamiento de la DM tipo II (Pérez López et al., 2010).

1.1 PATOLOGÍA: DIABETES MELLITUS TIPO II

La DM es una de las enfermedades crónicas y degenerativas que ha estado presente en la historia de la humanidad. En las últimas décadas el número de diabéticos se ha incrementado en el mundo, principalmente el de diabéticos tipo II, como consecuencia de la obesidad y de la inactividad física.

La DM es una enfermedad determinada genéticamente, en la que el sujeto que la padece tiene alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grado variable de resistencia a esta. Cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, por complicaciones microangiopáticas, en especial renales, oculares y neuropatía, así como macroangiopatías con afecciones de arteria coronarias y enfermedad vascular periférica (Hernández, 2011).

1.2 CLASIFICACIÓN

Actualmente existen dos clasificaciones principales: la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA).

Según el comité de expertos de la ADA, los diferentes tipos de diabetes se clasifican en cuatro grupos:

- a. DM tipo I
- b. DM tipo II
- c. Otros tipos de DM
- d. Diabetes Gestacional

DM tipo I: Anteriormente era llamada insulino dependiente. Característicamente se da en niños o jóvenes.

Se da un déficit absoluto de insulina dado por la destrucción de las células betas del páncreas, por procesos autoinmunitarios o idiopáticos (de causa desconocida).

En los primeros años de la enfermedad suelen quedar reservas pancreáticas que permiten una secreción mínima de insulina, y posteriormente existe un déficit absoluto de la secreción de la misma. Cerca del 40% de las personas con diabetes tipo I presentan neuropatías severas e insuficiencia renal antes de los 50 años de edad.

DM tipo II: anteriormente era llamada DM no insulino dependiente. Se presenta a menudo en adultos. Se caracteriza por un déficit relativo en la producción de insulina y un déficit en la utilización periférica de glucosa por los tejidos (resistencia a la insulina).

Alguna de las personas que padecen esta patología controlan la concentración sanguínea de glucosa realizando una dieta adecuada y haciendo ejercicio, otras deberán tomar fármacos que estimulen la producción de insulina, y así disminuir la resistencia a la misma y la salida de glucosa del hígado o fármacos que reduzcan la velocidad de absorción de los hidratos de carbono en el tracto gastrointestinal.

Otros tipos de DM:

- Tipo 3A: es un defecto genético en la célula beta.

- Tipo 3B: resistencia a la insulina determinada genéticamente (Resistencia a la insulina tipo A, Leprechaunismo, Síndrome de Rabson-Mendenhall y Síndrome de lipodistrofia).
- Tipo 3C: enfermedades del páncreas exócrino: pancreatitis, pancreatectomía, neoplasias, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatectomíafibrocelulocalculosa, mutaciones en la carboxi éster lipasa).
- Tipo 3D: es causada por efectos hormonales.
- Tipo 3E: causada por compuestos químicos o fármacos
 - ✓ Inducida por drogas o químicos
 - ✓ Por Ácido nicotínico
 - ✓ Por glucocorticoides
 - ✓ Por hormonas Tiroideas
 - ✓ Por agonistas beta adrenérgicos.
- Endocrinopatías, Síndrome de Cushing, acromegalia, glucagonoma, hipertiroidismo, feocromocitoma, somatostatina, aldosteronoma.
- Infecciones: rubéola congénita, citomegalovirus.
- Otros Síndromes genéticos en ocasiones relacionados con diabetes: síndrome de Down, de Klinefelter, de Turner, de Wolfram, de Laurence Moon-Biedl, Prader-Willi, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, porfiria.

Diabetes gestacional: también es llamada diabetes del embarazo; aparece durante la gestación en un porcentaje de 1 a 14% de las pacientes, y casi siempre debuta en las semanas 24 a 28 del embarazo; ocasionalmente persiste después del parto y es asociada a un incremento de trastornos en la madre (hipertensión arterial, infecciones vaginales, o en vías urinarias, parto prematuro o cesárea) y daño grave en el bebé.

El embarazo constituye un esfuerzo metabólico en el cuerpo de la madre ya que el bebé utiliza sus órganos para obtener alimentos (energía), oxígeno y eliminar sus desechos. Por esta razón la mujer embarazada tiene mayor posibilidad de presentar una deficiencia de insulina.

Existen grados variables de resistencia a la insulina, trastornos de la secreción de insulina y aumento de la producción de glucosa.

Si la elevación de glucosa se presenta desde los inicios del embarazo, existen posibilidades de que se presenten malformaciones en el feto, como malformaciones cardiovasculares, renales, del sistema nervioso o del sistema musculo-esquelético, así como muerte fetal o macrosomía (crecimiento exagerado del feto debido a que está expuesto a mayor cantidad de glucosa que lo habitual, lo que por lo general lo lesiona al momento de pasar por el canal de parto) (Vudoyra García, 2011).

1.3 TRATAMIENTO DE LA DIABETES

Objetivo del tratamiento: Los objetivos del tratamiento para la diabetes son aliviar los síntomas relacionados con la hiperglucemia (fatiga, poliuria, etc.) y prevenir o reducir las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes. El logro de los objetivos requiere un tratamiento multidisciplinario (médicos, enfermeras educadoras, personal de farmacia) con experiencia en farmacología, nutrición y educación del paciente. En el plan terapéutico es fundamental que el paciente participe en forma activa en la atención de su diabetes.

Se valora el control glucémico al utilizar mecanismos para medición a corto plazo (medición de la glucosa en sangre por el propio paciente) y mediciones a largo plazo (HbA1c, fructosamina).

Utilizando las mediciones de glucosa en sangre capilar, el paciente valora su glucemia en forma regular (en ayuno, antes de consumir alimentos, en el periodo posprandial) y reporta las cifras al equipo para el control de la diabetes.

Tratamiento no farmacológico: hace referencia a una nutrición saludable y ejercicio físico. Además es de gran importancia la participación de educadores certificados y de personal sanitario (enfermera, nutricionista o personal de farmacia) especializados en educación de pacientes. En términos de régimen alimentario, la ADA utiliza el término tratamiento médico nutricional para describir el régimen alimentario que coordina el consumo de calorías y otros aspectos de la diabetes como fármacos y ejercicios. En diabetes tipo 1 es de gran importancia equilibrar el

consumo de calorías con la dosis de insulina. En la DM tipo II, la dieta se dirige a perder peso, disminuir la presión arterial y el riesgo de aterosclerosis. El ejercicio proporciona múltiples beneficios para pacientes con diabetes, pero la dosificación del tratamiento hipoglucemiante puede requerir ajustes para evitar la hiperglucemia relacionada con el ejercicio.

Además de las modificaciones en el estilo de vida, los principales métodos no farmacológicos incluyen descenso de la progresión del metabolismo normal de la glucosa con cirugía bariátrica.

Varios procedimientos, lo que incluye la colocación de bandas gástricas, derivación gástrica y derivación biliopancreática mejoran la tolerancia a la glucosa y previene o corrigen la diabetes tipo II.

Tratamiento farmacológico con insulina:

La insulina es la base para el tratamiento de casi todos los individuos con DM tipo I y muchos de los individuos con DM tipo II; puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. El tratamiento a largo plazo depende principalmente de inyecciones subcutáneas. La administración subcutánea de insulina difiere de la secreción fisiológica de la hormona en dos formas principales:

- ❖ La cinética de absorción no produce el incremento rápido y disminución de la insulina endógena en respuesta a la administración de glucosa después de la administración oral o intravenosa.
- ❖ La insulina inyectada se administra a la circulación periférica en lugar de liberarse hacia la circulación portal. Así, la proporción de insulina portal/periférica no es fisiológica y esto puede alterar la influencia de la insulina en el metabolismo hepático.

No obstante, la insulina suministrada a la circulación periférica puede causar glucemia normal o casi normal.

Secretagogos de insulina e hipoglucemiantes orales

Diversas **sulfonilureas de primera generación** (clorpropamida, tolazamida, tolbutamida) y **sulfonilureas de segunda generación** (glimepirida, glipizida, glibenclamida) **meglitinidas** (repaglinida, nateglinida), **agonistas de GLP-1** (exenatida) e **inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)** (saxagliptina, sitagliptina, vildagliptina) se utilizan como secretagogos para estimular la liberación de insulina.

Dentro de los hipoglucemiantes orales podemos mencionar a las **biguanidas** (Metformina) y las **tiazolidinedionas**.

1. Sulfonilureas:

Mecanismo de acción: la sulfonilurea estimula la liberación de insulina al unirse a un sitio específico en el complejo de conductos K ATP en las células betas (receptor de sulfonilureas, SUR) e inhiben su actividad. La inhibición del conducto K ATP causa despolarización de la membrana celular y una serie de eventos que conducen a la secreción de insulina. Este grupo de fármaco se utiliza en pacientes con DM tipo II.

Absorción, distribución y eliminación: todas se absorben de manera eficaz en el tubo digestivo. Sin embargo, los alimentos y la hiperglucemia pueden reducir la absorción. Las sulfonilureas se unen en plasma principalmente a proteínas en especial a la albumina. Presentan una semivida corta (3 a 5 h), los efectos hipoglucemiantes son evidentes por 12 a 24 h y a menudo pueden administrarse una vez al día. El hígado metaboliza todas las sulfonilureas y los metabolitos se eliminan en la orina.

Efectos secundarios e interacciones medicamentosas que pueden causar:

- Hipoglucemia que podría llegar al coma.
- Náuseas, vómitos, ictericiacolestásica, agranulocitosis, anemia aplásica y hemolítica.
- Reacciones de hipersensibilidad generalizada y reacciones dermatológicas.
- El etanol puede incrementar la acción de la sulfonilurea y causar hipoglucemia.

- El efecto hipoglucemiante se potencia con alguno de los siguientes fármacos: andrógenos, anticoagulantes, antimicóticos azólicos, cloranfenicol, fluconazol, gemfibrozilo, sales de magnesio, metildopa, inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), probenecid, sulfonamidas, antidepresivos tricíclicos y acidificadores urinarios.
- Otros fármacos pueden disminuir el efecto de las sulfonilureas: antagonistas de los conductos de calcio, bloqueadores beta, colestiramina, estrógenos, ácido nicotínico, fenotiazinas, rifampicina, simpaticomiméticos, diuréticos tiazídicos y alcalinizantes urinarios.

2. Meglitinidas:

Mecanismo de acción: al igual que las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina al cerrar los conductos de K ATP en las células betas del páncreas. Este grupo es utilizado en pacientes con DM tipo II.

- ✓ Repaglinida: se absorbe con rapidez en el tubo digestivo y alcanza sus concentraciones máximas en una hora. La semivida es casi de una hora. Se metaboliza principalmente en el hígado a derivados inactivos.

Debe utilizarse con precaución en individuos con insuficiencia hepática. Una pequeña proporción del fármaco (cerca del 10%) es metabolizada en el riñón, por lo que la dosificación en pacientes con insuficiencia renal debe llevarse a cabo con gran precaución. El efecto secundario principal es la hipoglucemia. Ciertos fármacos pueden potenciar su acción (bloqueadores beta, cloranfenicol, cumarínicos, MAOI, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, probenecid, salicilatos y sulfonamidas), otros pueden alterar su metabolismo (itraconazol, trimetoprim, ciclosporina, simvastatina, claritromicina).

- ✓ Nateglinida: favorece una secreción más rápida pero menos sostenida de insulina que otros antidiabéticos orales disponibles. Se metaboliza principalmente a nivel hepático. Algunos fármacos reducen el efecto hipoglucemiante de la nateglinida (corticosteroides, rifamicinas, simpaticomiméticos, diuréticos tiazídicos, productos tiroideos), potencian su

efecto el alcohol, antiinflamatorios no esteroideos, MAOI, y bloqueadores betas no selectivos.

3. Agonistas LGP 1: Exenatida

Mecanismo de acción: la activación del receptor LGP 1. Estos receptores se expresan en células beta, células en el sistema nervioso central y periférico, corazón y vasos sanguíneos, riñón, pulmón y mucosa gastrointestinal.

Absorción, distribución, metabolismo, excreción y dosificación: se administra en inyección subcutánea dos veces al día, por lo común antes de los alimentos; se absorbe con rapidez, alcanza concentraciones máximas en casi 2 h, sufre poco metabolismo en la circulación y tiene un volumen de distribución de casi 30 L. La eliminación del fármaco ocurre principalmente por filtración glomerular, con proteólisis y reabsorción tubular mínimas.

Efectos secundarios e interacciones farmacológicas:

- Náuseas y vómitos en forma dependiente de la dosis.
- Estreñimiento.

4. Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4):

Mecanismo de acción: DPP-4 es una serina proteasa que tiene distribución amplia en todo el cuerpo y se expresa como ectoenzima en las células endoteliales, en la superficie de los linfocitos T y en forma circulante. Desdobla los aminoácidos del extremo amino terminal de péptidos con prolina o alanina en la segunda posición.

Absorción, distribución, metabolismo y excreción: se absorben de manera eficaz en el intestino delgado. Circulan principalmente en su forma no unida a proteínas y se excretan en su mayor parte sin cambios en la orina. No se unen a la albumina ni

afectan el sistema de citocromo oxidasa hepática. Se excretan por vía renal y deben utilizarse dosis más bajas en pacientes con reducción de la función renal.

Efectos secundarios e interacciones farmacológicas: No existen efectos secundarios consistentes destacados.

5. Hipoglucemiantes orales: dentro de este grupo de fármacos se encuentran las biaguanidas (metformina) y las tiazolidinedionas (rosiglitazona, pioglitazona).

- ✓ Metformina: el mecanismo de acción es incrementar la actividad de la proteína con quinasa dependiente de AMP (AMP K). La AMP K es activada por fosforilación cuando se reducen las reservas de energía celular (es decir, se reducen las concentraciones de ATP y de fosfocreatina). La proteína quinasa dependiente de AMP activada estimula la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y el metabolismo no oxidativo y reduce la lipogénesis y la gluconeogénesis. El resultado neto de esas acciones es el incremento en el almacenamiento de glucógeno en músculo estriado, menores tasas de producción de glucosa hepática y aumento de la sensibilidad a la insulina con reducción en la glucemia.

Se ha demostrado que la metformina inhibe la respiración celular por acciones específicas en el complejo I mitocondrial. La metformina tiene pocos efectos sobre las concentraciones de glucosa en estados de normoglucemia y no afecta la liberación de insulina o de otras hormonas de los islotes y rara vez causa hipoglucemia. Sin embargo, incluso en personas con hiperglucemia leve, la metformina reduce las concentraciones de glucosa al disminuir la producción hepática de glucosa e incrementar la captación periférica de la misma.

La metformina se absorbe principalmente en el intestino delgado, no se une a proteínas plasmáticas y se excreta sin cambios en la orina. Tiene una semivida en circulación de casi dos horas.

Los efectos secundarios más comunes son gastrointestinales como náuseas, indigestión, dolor abdominal cólico, distensión, diarrea o alguna combinación de estos síntomas.

Los fármacos catiónicos (cimetidina, furosemida y nifedipina) que se eliminan por secreción tubular renal tienen el potencial de interactuar con metformina por competición del sistema del transporte tubular renal comunes.

- ✓ Tiazolidinedionas: son ligandos del receptor activador de la proliferación del peroxisoma gamma (PPAR gamma), un grupo de receptores hormonales nucleares que participan en la regulación de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y de los lípidos.

Ambos fármacos se absorben en 2 a 3 h y la biodisponibilidad no parece afectarse con los alimentos. Se metabolizan en el hígado y pueden administrarse a pacientes con insuficiencia renal, pero no deben utilizarse en individuos con hepatopatía activa o elevaciones significativas de las transaminasas séricas hepáticas.

Los efectos adversos más comunes son el incremento de peso y el edema. El incremento de la incidencia de insuficiencia cardíaca congestiva es de gran preocupación entre los efectos secundarios de estos fármacos.

Otros fármacos hipoglucemiantes:

6. Inhibidores de la alfa glucosidasa (acarbose, miglitol)

Mecanismo de acción: reducen la absorción intestinal del almidón, dextrinas y disacáridos al inhibir la acción de la alfa glucosidasa en el borde intestinal en cepillo. La inhibición de esta enzima hace más lenta la absorción de carbohidratos en el tubo digestivo y evita el incremento súbito de las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa. Dichos fármacos también incrementan la liberación de la hormona glucoreguladora GLP-1 hacia la circulación, lo que puede contribuir a sus efectos hipoglucemiantes.

Absorción, distribución, metabolismo, y excreción: la acarbosa se absorbe poco y las pequeñas cantidades del fármaco que alcanzan la circulación sistémica se elimina a través del riñón. La absorción del miglitol es saturable; 50 a 100% de cualquier dosis tomada alcanza la circulación, este se elimina casi por completo por vía renal.

Efectos secundarios e interacciones farmacológicas:

- Mala absorción, flatulencia, diarrea y distensión abdominal.
- Hipersensibilidad cutánea (poco común).
- Están contraindicados en pacientes con insuficiencia renal en etapa 4.
- La acarbosa puede disminuir la absorción de digoxina.
- El miglitol disminuye la absorción de propranolol y ranitidina.

7. Pramlintida

Mecanismo de acción: el péptido amiloide de los islotes (amilina) es un péptido de 37 aminoácidos producidos en las células betas del páncreas y se secreta junto con la insulina. Se ha desarrollado una forma sintética de amilina con varias modificaciones de aminoácidos para mejorar la biodisponibilidad, denominada pramlintida como fármaco para el tratamiento para la DM tipo I y II.

Al parecer media sus acciones a través de la unión específica a los receptores de amilina en regiones específicas del rombencéfalo. La activación del receptor de amilina causa reducción en la liberación de glucagón, retraso del vaciamiento gástrico y saciedad.

Absorción, distribución, metabolismo, excreción: se administra como inyección subcutánea antes de los alimentos; no se une ampliamente a las proteínas plasmáticas y tiene una semivida de 50 min. El metabolismo y eliminación es principalmente a través del riñón.

Efectos secundarios e interacciones medicamentosas:

- Náuseas e hipoglucemia.
- Contraindicada en pacientes con gastroparecia o con trastornos de la motilidad.
- Puede retrasar el vaciamiento gástrico.
- Puede alterarse la farmacocinética de medicamentos que requieran la absorción rápida en el tubo digestivo.

8. Resinas fijadoras de ácidos biliares

Mecanismo de acción: las resinas fijadores de ácidos biliares reducen las concentraciones plasmáticas de glucosa en individuos diabéticos.

El único fijador de ácidos biliares aprobado específicamente para el tratamiento de la DM tipo II es el colesevelam.

Absorción, distribución, metabolismo, excreción: El colesevelam se encuentra disponible como polvo para solución oral y en forma de comprimidos; por lo común se utilizan tres comprimidos dos veces al día antes del almuerzo y de la cena o bien seis comprimidos antes de la comida principal del paciente. El fármaco se absorbe en el tubo digestivo en cantidades mínimas de forma que su distribución se limita al tubo digestivo.

Efectos secundarios e interacciones medicamentosas:

- Gastrointestinales (estreñimiento, dispepsia, dolor abdominal, náuseas que afectan hasta 10% de pacientes que reciben el tratamiento).
- Incremento de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos en personas con tendencia a la hipertrigliceridemia.
- Puede interferir en la absorción de fármacos como warfarina, difenilhidantoinato, verapamilo, glibenclamida, levotiroxina y etinilestradiol, estos medicamentos deben administrarse 4h antes del colesevelam.
- Puede interferir en la administración de vitaminas liposolubles.

9. Fármacos basados en GLP-1:

Las incretinas son hormonas gastrointestinales que se liberan después de los alimentos y estimulan la secreción de insulina. Las dos incretinas mejor conocidas son GLP-1 y GIP.

Aunque estos péptidos comparten muchas similitudes, difieren porque GIP no es eficaz para estimular la liberación de insulina y para reducir la glucemia en personas con DM tipo II, en tanto que GLP-1 sí es eficaz.

Cuando se administra por vía intravenosa a personas diabéticas en cantidades suprafisiológicas, el GLP-1 estimula la secreción de insulina, inhibe la liberación de guagón, retrasa el vaciamiento gástrico, reduce el consumo de alimentos y normaliza la secreción de insulina posprandial y en ayuno.

10. Agonistas de los receptores GLP-1:

Existen dos agonistas de receptores de GLP-1: exenatida y liraglutida.

El mecanismo de acción de ambas es la activación del receptor de GLP-1. Los receptores de GLP-1 se expresan en las células beta, células en el sistema nervioso central y periférico, corazón y vaso sanguíneo, riñón, pulmón y mucosa gastrointestinal. La unión de agonistas del receptor GLP-1 activa la vía de cAMP-PKA y varios factores de intercambio de nucleótidos de guanina. La activación del receptor GLP-1 también inicia las señales a través de PKA y de PI3K y altera la actividad de varios conductos iónicos. En las células beta, el resultado final de estas acciones es el incremento en la biosíntesis de insulina y la exocitosis en una forma dependiente de la glucosa.

Absorción, distribución, metabolismo y excreción: la exenatida se administra en inyección subcutánea dos veces al día por lo común antes de los alimentos; se absorbe con rapidez, alcanza concentraciones máximas en casi 2 h, sufre poco metabolismo en la circulación y tiene un volumen de distribución de casi 30 L. La eliminación del fármaco ocurre principalmente por filtración glomerular, con proteólisis y reabsorción tubular mínimas.

La liraglutida se administra en inyección subcutánea una vez al día. Alcanza sus concentraciones máximas en 8 a 12 h y la semivida de eliminación es de 12 a 14 h. Existe poca excreción renal o intestinal y la eliminación depende principalmente de la vía metabólica de las proteínas plasmáticas.

Efectos secundarios e interacciones farmacológicas:

- Náuseas, vómitos
- Retrasan el vaciamiento gástrico
- Alteran la farmacocinética de fármacos como: anticonceptivos orales y antibióticos (Powers y D'Alessio, 2012).

1. 4 NUEVOS TRATAMIENTOS PARA LA DIABETES

En este capítulo se desarrolla un nuevo fármaco para el tratamiento de la DM tipo II: inhibidores del cotransportador de sodio y glucosa tipo II (SGLT2).

El riñón se ha considerado principalmente un órgano de eliminación y un regulador de la sal y del equilibrio iónico. Actualmente es reconocido como un actor importante en el ámbito de la regulación del metabolismo de la glucosa. Durante el ayuno el 55% de la glucosa proviene de la gluconeogénesis. Solo dos órganos intervienen en este proceso metabólico: el hígado y el riñón. Este último es responsable del 20% de la producción total de glucosa y del 40% de la glucosa producida por la gluconeogénesis. En el riñón el cotransportador principal de la reabsorción tubular de glucosa es el SGLT 2.

1.5 EL RIÑÓN Y LA REGULACIÓN DE LA GLUCOSA: filtración y reabsorción de la glucosa en el riñón.

Los glomérulos de un adulto sano filtran 180 gramos de glucosa cada día aproximadamente. En circunstancias normales, casi toda la glucosa se reabsorbe y menos del 1% se excreta en la orina. La reabsorción de glucosa a partir de los túbulos es un proceso de múltiples pasos con participación de varios mecanismos de transporte. Una vez filtrada la glucosa en el túbulo, deberá ser transportada fuera del mismo, a través de las células epiteliales tubulares, y después, a través de la membrana basolateral, hacia el capilar peritubular. En condiciones óptimas, cuando la carga de glucosa tubular es de aproximadamente 120 miligramos/minutos o menos, no se pierde la glucosa en orina. Sin embargo cuando la carga de glucosa excede aproximadamente los 220miligramos/minutos (el denominado umbral de glucosa), la glucosa comienza a aparecer en la orina.

El valor de la glucosa en sangre necesaria para proporcionar dicha carga tubular no es un valor establecido en los seres humanos, sino que es un rango.

Un estudio de evaluación de este proceso informo que la concentración de glucosa en sangre necesaria para superar el umbral de la glucosa tubular oscila entre 130 y 300 miligramos/decilitros.

Además, el estudio encontró una relación entre la edad y un aumento en los niveles del umbral.

El 90% de la glucosa filtrada se reabsorbe por la alta capacidad del cotransportador SGLT 2 en el segmento contorneado del túbulo proximal, y el 10% restante de la glucosa filtrada se reabsorbe por el transportador SGLT 1 en el segmento recto del túbulo proximal descendente. El resultado muestra que no aparece glucosa en la orina. Clínicamente la causa más frecuente de glucosuria es la diabetes. Por lo tanto los pacientes no excretan glucosa en la orina hasta que su concentración de glucosa en sangre es superior a 180 miligramos/decilitros, lo que no ocurre normalmente en los individuos sin diabetes.

1.6 FUNCIÓN DEL COTRANSPORTADOR SGLT2

El primer paso en la reabsorción de la glucosa de la orina implica el transporte de glucosa desde los túbulos a los capilares peritubulares a través de las células epiteliales tubulares.

Esto se logra con la familia de cotransportadores sodio-glucosa (SGLT). Los SGLT incluyen una gran variedad de proteínas de membrana que actúan en el transporte de glucosa, aminoácidos, vitaminas, iones y osmolitos a través de la membrana del borde en cepillo de los túbulos renales proximales, así como el epitelio intestinal. SGLT 1 es un transportador de baja capacidad y alta afinidad. Se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal, pero también se puede encontrar en el segmento S3 del túbulo proximal renal. Aunque SGLT1 es el transportador clave de la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal, su impacto en el riñón es menos importante; representa alrededor del 10% de la reabsorción de la glucosa.

Esto ha sido de algún interés farmacológico porque el bloqueo de este transportador, teóricamente, atenúa la absorción gastrointestinal de glucosa y podría ofrecer un método para inducir la pérdida de peso o reducir la hiperglucemia postprandial.

Por el contrario, SGLT 2 es un cotransportador de gran capacidad y de baja afinidad, y se encuentra principalmente en el riñón. Las mutaciones de pérdida de la función en SGLT2 causan glucosuria.

Aunque se han identificado otros miembros de esta familia (SGLT3, SGLT4, SGLT5 y SGLT6, el de mayor prevalencia e importancia funcional en el riñón es SGLT2.

Este cotransportador se encuentra en una densidad relativamente alta en el segmento S1 (el segmento inicial) del túbulo proximal. SGLT2 transporta glucosa aprovechando el gradiente de energía de la reabsorción de sodio en el filtrado tubular. Este proceso recibe el nombre de transporte activo secundario y es impulsado por el gradiente electroquímico de sodio en el filtrado tubular.

1.7 INHIBIDORES DEL COTRANSPORTADOR SGLT2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA DM TIPO II

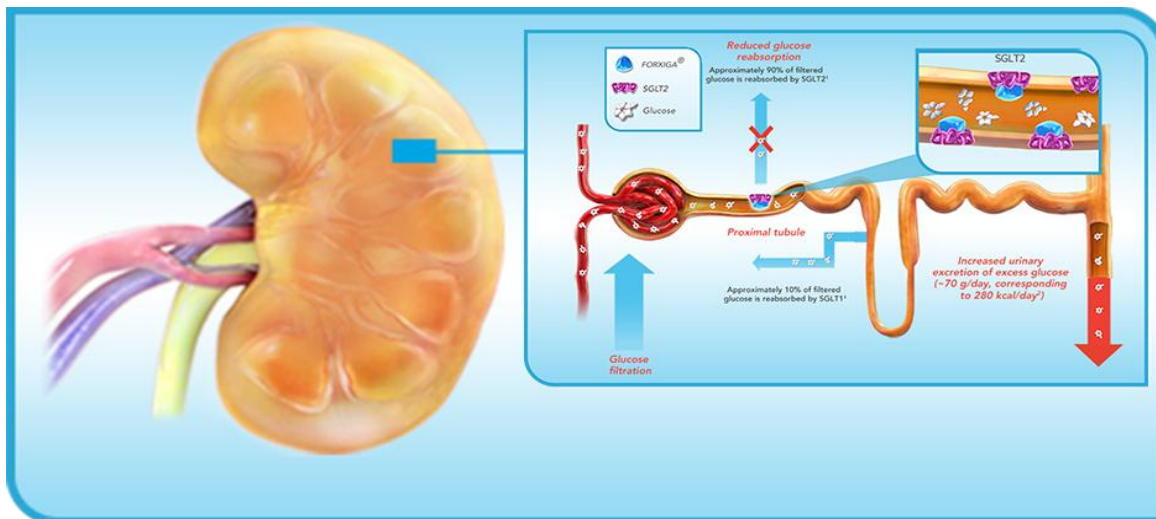


Figura 1. Mecanismo de inhibición del cotransportador SGLT2 en el túbulo proximal.

En 1835, químicos franceses aislaron una sustancia, la florizina, de las raíces de los manzanos. Aunque se creyó que la florizina era un compuesto para tratar la fiebre, las enfermedades infecciosas y la malaria, no fue hasta 50 años después de su descubrimiento que se encontró que altas dosis de florizina causaban glucosuria.

Durante varias décadas, la florizina fue utilizada para la valoración de la fisiología renal. Fue en 1970 cuando se descubrió que la glucosuria inducida por la florizina se debía a que inhibía un sistema activo de transporte responsable de la reabsorción tubular de glucosa. Entre 1980 y 1990 se identifica al cotransportador SGLT2, y se comienza a perfilar la inhibición de este cotransportador como tratamiento de la DM tipo II. Por tanto, la florizina ha sido el primer inhibidor conocido de SGLT2.

Sin embargo, la florizina no pudo utilizarse como tratamiento de la DM tipo II por varias razones. En primer lugar, porque la absorción intestinal es muy pobre, y en segundo, porque no es un inhibidor selectivo de SGLT2, ya que también es capaz de inhibir SGLT1, causando en la mayoría de los casos diarrea osmótica (Pérez López et al., 2010).

La inhibición de SGLT2 puede reducir los niveles de glucosa plasmática al reducir el transporte máximo de la glucosa, lo que se traduce en aumento de la excreción urinaria de glucosa.

En humanos, los inhibidores del SGLT2 inhiben entre el 30 y el 50% de la reabsorción renal de glucosa (Rodríguez Ramírez et al., 2014).

Actualmente se han desarrollado fármacos análogos de florizina que son selectivos para SGLT2 y con una mejor absorción intestinal. Algunos fármacos de este grupo son dapagliflozina y canagliflozina, que actualmente se encuentran en ensayo clínicos de fase III.

De los inhibidores SGLT2, el más desarrollado es el dapagliflozina.

- FARMACOCINÉTICA

La dapagliflozina se absorbe rápidamente después de la administración oral en pacientes con DM tipo II, en un tiempo promedio de 1 h (0,5 – 4,0 h). Un estudio de fase I en voluntarios sanos sugirió que la absorción es más lenta cuando se administra junto con comidas, aunque esta diferencia fue mínima. La vida media de dapagliflozina es aproximadamente de 16 horas. La glucosuria es dosis-dependiente.

Este fármaco al inhibir a SGLT2 de forma selectiva y reversible, ocasiona la eliminación de aproximadamente 70 gramos de glucosa por orina al día.

El aclaramiento renal de la dapagliflozina es mínimo (3-6 mililitros/minutos) y su excreción renal es baja (menos del 2.5% en orina de 24 horas). Estudios *in vitro* han sugerido que dapagliflozina se metaboliza por inactivación metabólica por la vía de la enzima glucunoriltransferasa.

Dapagliflozina ha demostrado tener un efecto hipoglucemiante a dosis de 2,5; 5; 10; 20; y 50 miligramos diarios en ensayos clínicos de fase II. La mayoría de los ensayos clínicos de fase III que están en curso evalúan los efectos de dosis diarias de 2,5; 5 y 10 miligramos.

Los inhibidores de SGLT2 son un grupo novedoso de fármacos que parecen aportar varias ventajas en el tratamiento de la DM tipo II:

- 1- Peso: los inhibidores de SGLT2 promueven la pérdida de peso al incrementar la glucosuria (1 gramo de glucosa equivale a 4 kilo calorías), lo que disminuye los niveles plasmáticos de glucosa y estimula la lipólisis.
- 2- Corrige mecanismos alterados en la DM tipo II. En los pacientes diabéticos se ha demostrado que existe un aumento en la reabsorción tubular de glucosa.
- 3- Efectos adversos: la hipoglucemia habitualmente es una barrera a la hora de plantear estrategias de control glucémico óptimo. Como la inhibición de SGLT2 es completamente independiente de la secreción de insulina, no hay aumento del riesgo de hipoglucemia.
- 4- Tratamiento de la hiperglucemia: el mecanismo único de los inhibidores de SGLT2 hace que probablemente sean un complemento de otras terapias hipoglucemiantes.

Las mayores preocupaciones sobre la inhibición de SGLT2 son el riesgo de infecciones del tracto urinario, la depleción del volumen intravascular secundario a la diuresis osmótica, el desequilibrio hidroeléctrico, la nefrotoxicidad debido a la acumulación de productos finales de la glucosilación avanzada, la nicturia y las interacciones farmacológicas.

Se requieren estudios a largo plazo que respondan a estas consideraciones, aunque con la evidencia obtenida hasta este momento existen datos suficientes para considerar a los inhibidores de SGLT2 como fármacos seguros.

Los inhibidores de SGLT2 podrían no ser efectivos en pacientes con insuficiencia renal debido a la reducción de la tasa de filtración glomerular, aunque actualmente está en investigación (Zakerska et al., 2012).

Además es importante destacar que los efectos adversos varían de leves a moderados; sin embargo es necesario realizar ensayos clínicos aleatorios que tengan un seguimiento a largo plazo para identificar la seguridad de los inhibidores de SGLT2 y establecer la verdadera utilidad de estos fármacos en el tratamiento de los pacientes diabéticos.

Como nombramos anteriormente la dapagliflozina es metabolizada por la enzima glucuroniltransferasa. El gen que codifica esta enzima es el UGT1A9. Hay pacientes que presentan un polimorfismo en dicho gen que afecta la efectividad y eficacia del fármaco, ocasionando que éste no sea metabolizado correctamente. Esta situación probablemente produce un aumento en la toxicidad, ya que al permanecer más

tiempo en circulación sanguínea, genera mayores efectos adversos y posibles interacciones con otros fármacos. El polimorfismo más conocido de este gen es el UGT1A9*3 (rs72551330) en donde el cambio de un nucleótido (Timina por Citosina) produce una modificación en el codón 33 del aminoácido Metionina por Treonina (Kasichayanula et al., 2012).

2.0 OBJETIVOS

2.1 GENERALES:

- Búsqueda e identificación de variantes genéticas que afectan a la efectividad de los iSGLT2.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar la presencia de polimorfismos en genes asociados con la farmacodinamia y/o la farmacocinética de los iSGLT2.
- Realizar una puesta a punto en una técnica para la identificación del polimorfismo rs72551330 en el gen UGT1A9.

3.0 HIPÓTESIS

La presencia del polimorfismo UGT1A9*3 en el gen UGT1A9 puede ser puesto en evidencia a través de la técnica de PCR-RFLP.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio de tipo descriptivo y de carácter observacional, prospectivo y transversal.

4.2 PACIENTES CONTROLES

En este estudio se incluyó un total de 11 individuos de entre 20 a 80 años de edad que asistieron al Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba Capital, para realizarse los análisis de control de diabetes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas y el Ministerio de Salud de Córdoba y está de acuerdo con la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Individuos entre 20 y 80 años.
- Pacientes diabéticos tipo II.
- Pacientes medicados con metformina y dapagliflozina.
- Mujeres no embarazadas.

4.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Individuos menores de 20 años y mayores de 80 años.
- Pacientes no diabéticos tipo II.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con insuficiencia renal.

4.5 MUESTRAS

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® EDTA-K2 5.4 miligramos.
- ADN de sangre entera con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® EDTA-K2 5.4 mg, extraído según el método indicado por el kit comercial "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega).
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

4.6 PROCEDIMIENTOS

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

EXTRACCION DE ADN

Se utilizó el "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega)

El Wizard® DNA Purification está diseñado para la separación de ADN de los glóbulos blancos, tejidos de cultivos celulares, tejido animal y vegetal, levaduras y bacterias Gram positiva y negativas (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, 2010).

Este kit se basa en un proceso de 4 pasos: lisis celular, lisis nuclear, remoción de proteínas celulares mediante un precipitante y, concentración y desalinización del ADN mediante precipitación con isopropanol y lavado con etanol 70% (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, 2010).

PROCEDIMIENTO: 150 µL de sangre anticoagulada se lisaron con Cell Lysis Solution y Nucleic Lysis Solution. Luego, se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante.

Para la extracción del ADN se utilizaron distintas soluciones provistas por el fabricante (RNaseSolution, Protein Precipitation Solution) con posteriores centrifugaciones breves a 13.000 r.p.m. y para la precipitación del mismo se utilizó Isopropanol y Etanol 70%. Por último, el ADN extraído se re suspendió en ADN Rehydration Solution.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN MEDIANTE PCR: Al ADN extraído se le realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se tomó 1 µL de muestra de ADN, 3 µL de Colorless Reaction Buffer Taq 5x (Promega™), 0.12 µL de dNTPs (10 mM, Promega™), 0.12 µL de GoTaq Polimerasa® (5 U/ µl, Promega™), 1 µL de Primer Forward correspondiente, 1 µL de Primer Reverse correspondiente y se llevó a volumen final 15 µL con Agua bidestilada calidad biología molecular.

LOS PRIMERS UTILIZADOS FUERON:

- UGT1A9*3 (F/R) (10 pmol/ml, Operon™) para el polimorfismo rs72551330.
Primer Forward: 5'- ACGCCCTCTATTGGGGTCAG -3'
Primer Reverse: 5'- GCTTTCCATTGAGCATGGGC -3'

En la Tabla 1 se muestran los volúmenes utilizados en el método de amplificación por PCR

Tabla 1. Preparación de muestras para la amplificación por PCR.

| | |
|-----------------------|---------------|
| H2O | 14,60 μ L |
| Buffer 5X | 5 μ L |
| Primer Forward | 1,67 μ L |
| Primer Reverse | 1,67 μ L |
| dNTPs | 0,20 μ L |
| GoTaq | 0,20 μ L |
| ADN | 1,67 μ L |

Tiempos del proceso de PCR.

- a) Inicio: a 94° C por 2 minutos.
- b) Desnaturalización: a 94° C por 50 segundos.
- c) Hibridación: a 60° C por 50 segundos.
- d) Extensión: a 72° C por 1 minuto.
- e) Elongación Final: a 72° C por 5 minutos.
- f) Conservación: a 20° C.

Se repitieron cíclicamente las fases b-c-d por 35 veces.

Se utilizó el termociclador Biometra II®

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

A continuación se muestra la secuencia nucleotídica, en donde las letras subrayadas representan los primers y lo destacado en negrita indica el sitio donde va a actuar la enzima de restricción, siendo **Y** el lugar donde estaría la mutación o polimorfismo.

ACGCCCTCTATTGGGGTCAGGTTTTGTGCTGGTATTTCTCCACCTACTGTATCA
 TAGGAGCTTAGATTCCCAGCTGCTTGCTCTCAGCTGCAGTTCTCTGATGGCTTG
 CACAGGGTGGACCAGCCCCCTTCCTCTATGTGTGTGTCTGCTGCTGACCTGTG
 GCTTTGCCGAGGCAGGGAAGCTACTGGTAGTGCCCA

Y

GGATGGGAGCCACTGGTTCACCATGAGGTGCGGTGGTGGAGAACTCATTCTCA
 GGGGGCATGAGGTGGTTGTAGTCATGCCAGAGGTGAGTTGGCAACTGGGAAGA
 TCACTGAATTGCACAGTGAAGACTTATTCAACTTCATATACCCTGGAGGATCTGG
 ACCGGGAGTTCAAGGCTTTTGCCCATGCTCAATGGAAAGC

Y= C ó T

Se utilizó la enzima de restricción NcoI, esta enzima reconoce la siguiente secuencia, la cual hace referencia a la correspondiente a la de un paciente sin mutación, y corta, lo cual se visualiza en un gel de agarosa la presencia de dos fragmentos.

5'... C[^]C A T G G ... 3'
 3'... G G T A C [▲]C ... 5'

Interpretación:

Homocigota T/T: 200 + 200 pb

Homocigota C/C: 400 pb

Heterocigota C/T: 400 + 200 + 200 pb

La preparación de la muestra puede observarse en la Tabla 2. La digestión enzimática se realizó a 37 ° C por un periodo de 3 hs.

Tabla 2. Preparación para la digestión enzimática.

| | |
|---|--------------|
| Agua Bidestilada Calidad Biología Molecular | 1,7 µl |
| NEBuffer® Buffer 4 (10x, Biolabs™) | 2 µl |
| Enzima NcoI(20.000 UI/mL, Biolabs™) | 0,3 µl |
| Albúmina Sérica Bovina (20x, Biolabs™) | 1 µl |
| Producto de PCR | 15 µl |
| VF | 20 µl |

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para la electroforesis en gel de agarosa, el producto de digestión se sembró en un gel de agarosa (Agarosa MAX D1 Max Biología Molecular® 100g, Biodynamics™ SRL) al 2,5% P/V en buffer TAE (1X) y tinción con 2 µl de Solución de Bromuro de Etidio calidad biología molecular (10 mg/ml, Promega™).

En la corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (CienMarker® 250uL, Biodynamics™), fuente de poder BioRAD® (PowerPac Basic™) a 70V por 40 minutos. El gel fue observado en transluminador UV (Modelo TM-26, Labnet™).

5.0 RESULTADOS

A partir del producto de PCR realizamos la digestión enzimática (RFLP), con la enzima NcoI y los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

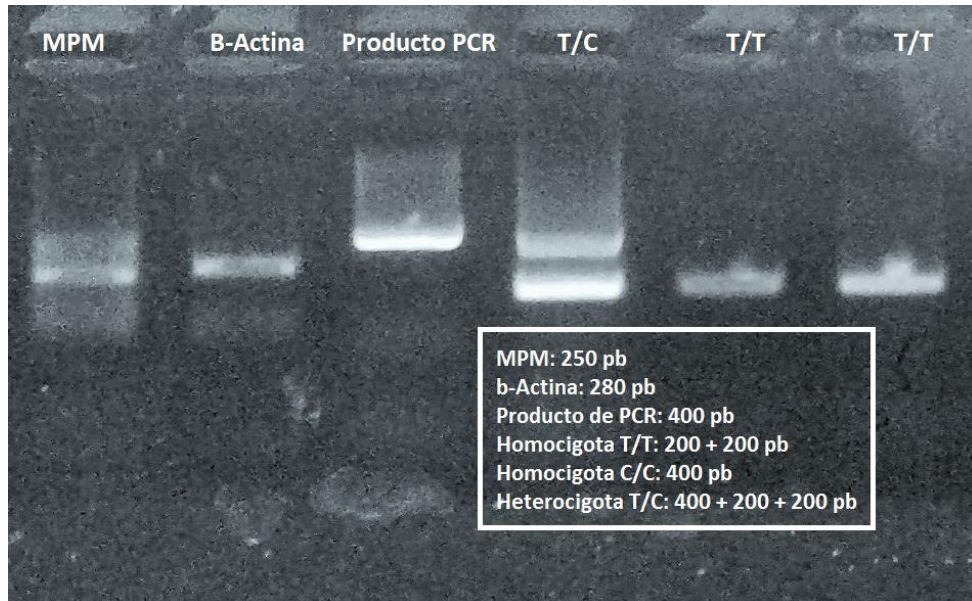
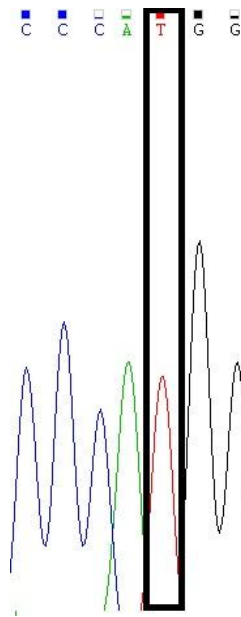


Figura 2. Electroforesis de la PCR-RFLP en gel de agarosa, bajo luz ultravioleta.

Luego de la digestión enzimática se tomó una muestra al azar para ser analizadas por secuenciación del ADN, a fin de verificar si los resultados obtenidos por la técnica de PCR – RFLP eran coincidentes.

La secuenciación es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento de ADN. Se puede utilizar la secuenciación del ADN para conocer las mutaciones somáticas, como las sustituciones de bases, generadas entre distintos organismos (Jiménez y Collada, 2008).

En la figura 3 se muestra el resultado de la secuenciación.



**Figura3. Electroforetograma del
fragmento amplificado**

En el caso de ser un paciente con el polimorfismo, como se explicó anteriormente se produce un cambio de una T (timina) por una C (citosina). En esta situación se mantiene la base pirimidínica T, por lo tanto, no es un paciente que sufre una mutación, sino que es un paciente sin la mutación. Esto puede observarse ya que, cuando el secuenciador lee el producto obtenido de la PCR, produce picos de diferentes colores según el nucleótido en cuestión (A, C, G o T).

6.0 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el polimorfismo (UGT1A9*3) en el gen UGT1A9 que codifica para la enzima glucuroniltransferasa que se encarga de metabolizar la dapagliflozina (entre otros fármacos) utilizada en el tratamiento de la DM tipo II. La presencia del polimorfismo puede afectar a la efectividad y eficacia del fármaco.

En los trabajos desarrollados por Zakerska y sus colaboradores, se realizaron diferentes análisis en donde se estudiaron variantes en el gen UGT1A9 en 308 muestras de sangre de individuos polacos (Zakerska O et al., 2012).

La amplificación de los fragmentos del gen UGT1A9 se llevó a cabo mediante PCR. Los resultados obtenidos mostraron que algunos individuos presentaban polimorfismos en el gen UGT1A9 en donde se cambiaba una Timina por una Citosina en la posición 98, siendo el sujeto heterocigoto para la variante estudiada. También encontraron que un 3,2 % de los individuos presentaban un cambio, M33T en el estado heterocigótico (Zakerska O et al., 2012).

En los pacientes estudiados en nuestra investigación, no se encontró el polimorfismo ya que trabajamos con diez muestras y dicha mutación es de baja frecuencia, se encontró uno en forma heterocigota. A diferencia del trabajo realizado por Zakerska que utilizó una elevada cantidad de muestras encontrando el polimorfismo.

Otras variantes que podrían afectar la efectividad de los inhibidores de SGLT2, son aquellas que se encuentren en el gen que codifica al cotransportador SGLT2 (SLCSA2), pero debido a las bajas frecuencias que presentan (de 1500 personas se encuentra 1 con el polimorfismo), se prefirió realizar este trabajo con el polimorfismo *3 en el gen UGT1A9.

7.0 CONCLUSIÓN

Se pudo comprobar la hipótesis planteada, ya que la técnica de PCR y la digestión enzimática (PCR-RFLP) puesta a punto funcionaron correctamente, además fueron corroboradas mediante la secuenciación del ADN.

Esto será de suma utilidad para continuar con el proyecto de investigación el cual tiene previsto reclutar más pacientes, lo que permitirá identificar la presencia del polimorfismo en los pacientes y poder realizar estudios de correlación de efectividad y eficacia farmacológica de la dapagliflozina.

8.0 BIBLIOGRAFIA

Cornejo Herrera A M. ¿Qué es la diabetes mellitus? En: Tejada Paiz J/ Velasco Aldrete J. Diabetes Mellitus. México: Editorial Alfil; 2011. 1.

Hernández E F. Numero de diabéticos en México y en el mundo.En: Tejada Paiz J/ Velasco Aldrete J. Diabetes Mellitus. México: Editorial Alfil; 2011.3-4.

Jiménez P, Collada C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación (en) Evaluación de la diversidad genética neutral.ForestSystems. 2008; 237-248

Kasichayanula S, LiuX,PeBenitoM,YaoM,Pfister M, LaCreta F, Humphreys W &Boulton D. British Journal of Clinical Pharmacology (en) The influence of kidney function on dapagliflozin exposure, metabolism and pharmacodynamics in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. 2012; 434-440.

Pérez López, O. González Albarrán, M. Cano Megías. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2(SGLT2): de la glucosuria renal familiar al tratamiento de la diabetes Mellitus tipo 2. Revista nefrología Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología [Internet]. 2010 [1 junio 2015]; 30(6):621.

PowersAlvin C, D'alessioD.Hormonas y antagonistas hormonales. En:Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12 edición.México: Mc Graw Hill; 2012.1248-1266.

Rodríguez Ramírez J, Robles Álvarez V, Madrigal Elizalde E, García Ayala M, Masuokalto D, Terrones Saldívar M. Lux Médica (en) Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2). Una nueva generación de fármacos para control de Diabetes Mellitus tipo 2. 2014; 23-30.

Vudoyra García E C. Tipos de diabetes. En: Tejada Paiz J/ Velasco Aldrete J. Diabetes Mellitus. México: Editorial Alfil; 2011.7-9.

Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual #TM050 (en línea). Promega Corporation Web site. Actualizado en 2010.

Zakerska O, Skrzypczak-Zielinska M, Mikstacki A, Tamowicz B, Malengowska B, Szalata M, Slomski R. Eur J Drug Metab Pharmacokinet (en) Genotype and allele frequencies of polymorphic UGT1A9 in the Polish population. 2012; 45-53.

.